

Transformação de células vegetais por bombardeamento de micropartículas

Formador Susana Serrazina (smserrazina@fc.ul.pt)

Objectivos

Conhecer a técnica de transformação de células vegetais por bombardeamento de micropartículas.

Introdução

Durante esta demonstração pretende-se transformar células de plantas do género *Nicotiana* com o gene repórter *gus*, o qual codifica a enzima β -glucuronidase. O material vegetal a transformar corresponde a explantes de folha.

O DNA plasmídico, neste caso, contém o gene reporter *gus* e os genes de selecção *amp^r* (confere resistência ao antibiótico ampicilina, para selecção em bactéria) e *hyg^r* (confere resistência ao antibiótico higromicina, para selecção em planta).

1. O aparelho Biolistics® PDS-1000/He

Na demonstração é utilizado um aparelho desenvolvido por Sanford *et al.* (1991), comercializado por Bio-Rad (figura 1).

O aparelho é composto por dois sistemas principais: o tubo de aceleração de gás que está ligado a uma garrafa de hélio e a câmara de amostragem (esquemática na figura 2), ligada a uma bomba de vácuo (figura 1A). O tubo de aceleração tem, numa das extremidades, um manómetro que indica a entrada de hélio. Na outra extremidade, que comunica com o interior da câmara de amostragem, está ajustada uma membrana circular laminada capaz de suportar uma determinada pressão de gás – o disco de rotura (figura 1B e C). No interior do compartimento principal do aparelho - câmara de amostragem - existem duas prateleiras, uma onde se encaixa o dispositivo de lançamento das micropartículas e outra onde é colocada uma caixa de Petri com as células ou tecidos a bombardear. O dispositivo de lançamento de micropartículas (figura 1C) é composto por:

- um anel metálico que serve de suporte a uma membrana de plástico circular com cerca de 2,54 cm de diâmetro e 0,06 mm de espessura. As partículas revestidas por DNA são transportadas na superfície dessa membrana, que é designada de macroprojectil;
- uma rede metálica circular – ecrã de paragem – que permite a passagem e dispersão das partículas e a retenção do macroprojectil na sua superfície.

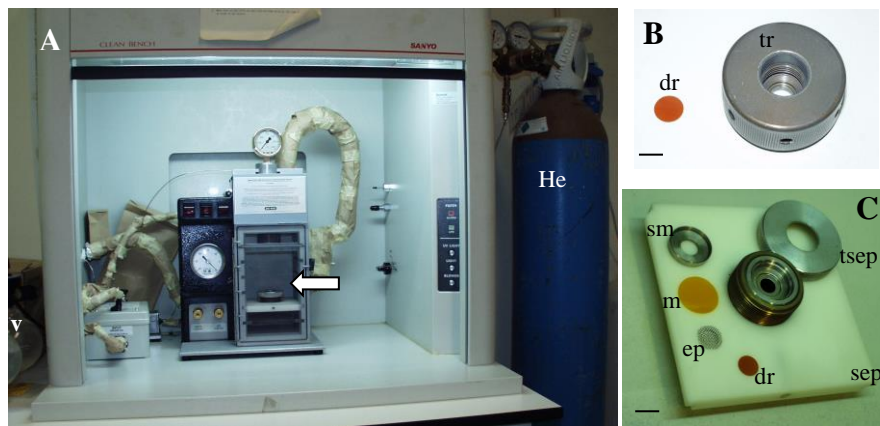


Figura 1. Aparelho Biolistics® PDS-1000/He e respectivos acessórios. **A:** vista geral do aparelho dentro de uma câmara de fluxo laminar; a seta indica a câmara de amostragem; v: bomba de vácuo; He: garrafa de hélio. **B e C:** acessórios; dr: disco de rotura; tr: tampa de retenção; m: macroprojectil; sm: suporte do macroprojectil; ep: ecrã de paragem; sep: suporte do ecrã de paragem; tsep: tampa do suporte do ecrã de paragem. Barras: aproximadamente 1 cm.

A força responsável pela aceleração das partículas a altas velocidades é resultante da libertação de hélio comprimido no interior do tubo de aceleração (figura 2a). A libertação do gás ocorre quando este atinge uma determinada pressão crítica que faz romper o disco de rotura. Quando o disco de rotura rasga é gerada uma onda de choque que atinge o macroprojectil (figura 2b) e o impele a alta velocidade em direcção ao ecrã de paragem. Aí, o macroprojectil é retido (figura 2c) e as partículas revestidas por DNA são projectadas sobre os tecidos ou células a transformar (figura 2d). Antes de cada um dos bombardeamentos é criado vácuo no interior da câmara de amostragem, baixando a pressão até cerca de 635 mm de Hg. Não é possível conseguir pressões mais reduzidas devido à existência de vapor de água e de ar residual na amostra biológica.

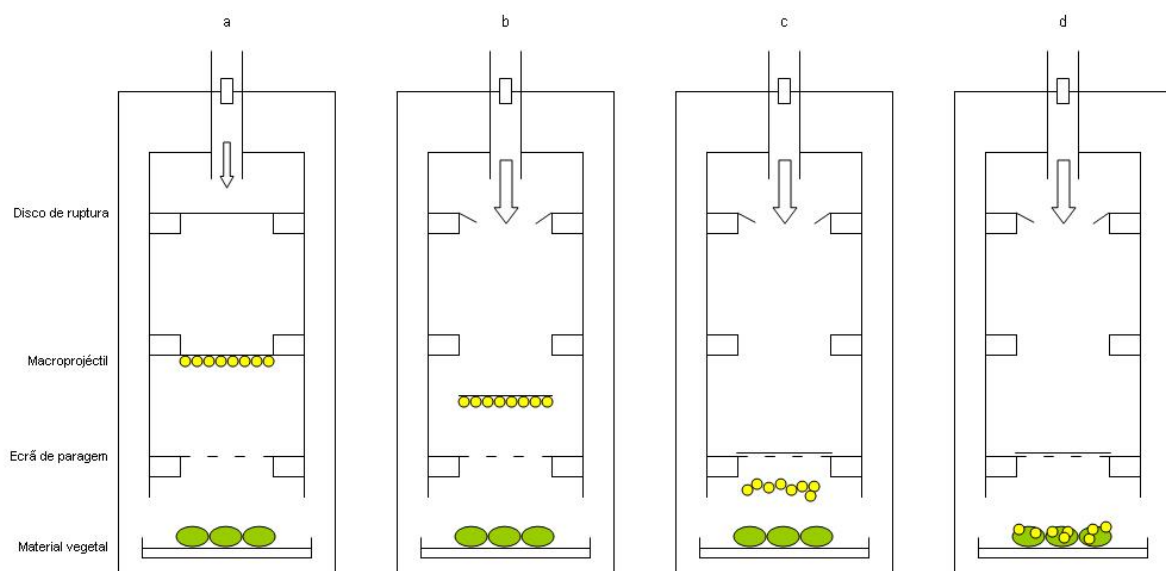


Figura 2. Esquema da câmara de amostragem do sistema de bombardeamento de partículas PDS-1000/He. **a:** o material vegetal é colocado numa câmara de vácuo (pressão no interior 27 mm Hg). **b:** assim que o vácuo é estabelecido, a pressão de hélio é aumentada até ao rasgo do disco de rotura, projectando o macroprojectil até à zona inferior da câmara de amostragem. **c:** o macroprojectil é parado ao nível do ecrã de paragem e os microprojecteis passam através do ecrã. **d:** os microprojecteis atingem o material vegetal.

A velocidade com que as micropartículas atingem as células-alvo depende de vários factores, tais como:

- a pressão com que o hélio é libertado;
- distância entre o disco de rotura e o macroprojectil;
- distância percorrida pelos projecteis revestidos.

A velocidade com que as micropartículas atingem as células-alvo será tanto maior quanto maior for a pressão de hélio à saída do tubo de aceleração, menor for a distância entre o disco de rotura e o macroprojectil, maior for a distância percorrida pelo macroprojectil e menor a distância percorrida pelos projecteis.

A pressão com que o hélio é libertado depende do disco de rotura utilizado. Existem diferentes discos de rotura, cada um capaz de suportar uma pressão que varia entre 450 e 2200 psi.

A distância entre o disco de rotura e o macroprojectil pode variar entre 0 e 3 cm.

No presente aparelho, a distância percorrida pelos projecteis pode ser de 3, 6, 9 ou 12 cm, de acordo com a posição da prateleira onde é colocada a amostra.

2. Material e Procedimento

2.1. Isolamento de DNA plasmídico por mini-preps (adaptado de Sambrook *et al.*, 1989)

Composição do Tampão 1:

- 50 mM de glucose;
- 25 mM de Tris-HCl, pH 8,0;
- 10 mM de EDTA;
- 10 µg/mL de RNase H (Sigma);

Armazena-se a 4°C.

Composição do Tampão 2 (a preparar na altura da extracção):

- 0,2 M de NaOH;
- 1% (p/v) de SDS (sodium dodecyl sulfate).

Composição do Tampão 3:

- 5M de KAc;
- 11,5% (v/v) de ácido acético glacial.

A Mini-prep corresponde ao isolamento de baixas quantidades de DNA plasmídico clonado em bactéria (até 100 µg em plasmídeos de alta cópia). Esta extracção permite isolar o DNA plasmídico com o(s) gene(s) de interesse a inserir na planta.

Colocam-se 2 mL de suspensão de *Escherichia coli*, crescida em meio líquido, em tubos de 2 mL. Centrifuga-se a 3300 x g, 6 minutos. Despreza-se o sobrenadante. Ressuspende-se as bactérias em 200 µL de Tampão 1, agitando com vórtex. Adicionam-se 200 µL de Tampão 2, mistura-se por inversão e coloca-se a -20°C, 5 minutos. Nesta fase ocorre a lise celular e a desnaturação irreversível do DNA cromossómico em meio básico. O DNA plasmídico, circular e de menor peso molecular, não é afectado. Adiciona-se 200 µL de Tampão 3 (neutralizando o tampão 2) e

mistura-se por inversão. Coloca-se a -20°C , 10 minutos. Centrifuga-se 15 minutos a $15000 \times g$. Retira-se o sobrenadante para um novo tubo. Nesta fase é rejeitado o precipitado com restos celulares. Adiciona-se ao sobrenadante 0,7 volumes de isopropanol (para precipitar o DNA plasmídico), agita-se levemente com vórtex e centrifuga-se a $15000 \times g$, 15 minutos. Descarta-se o sobrenadante e lava-se o *pellet* de DNA com etanol a 70% (v/v). Centrifuga-se 5 minutos a $15000 \times g$. Descarta-se o sobrenadante e deixa-se secar o *pellet*. Dissolve-se em Tris-HCl 10 mM pH 8,0. Coloca-se a 4°C durante a noite para ressuspensão completa. Armazena-se a -20°C . O DNA plasmídico é quantificado através de electroforese de agarose, podendo-se também verificar a sua pureza. O DNA plasmídico para transfecção deverá estar livre de contaminantes como RNA, DNA cromossomal ou polissacáridos. Para estimar a quantidade, pode-se correr paralelamente DNA λ (48,502 Kb) com concentração conhecida. Neste caso, o Jic200 tem 7665 pb.

2.2. Material vegetal

As plantas de tabaco em cultura *in vitro* são mantidas em meio de micropropagação MS (Murashige e Skoog, 1962), com vitaminas de MS e 20 g/L de sacarose.

O ensaio de bombardeamento é feito com partículas de ouro revestidas com DNA plasmídico de Jic200 (Hilliou *et al.*, 1999).

As partículas de ouro de cada ensaio são preparadas de acordo com os protocolos de Sanford *et al.* (1991), com algumas modificações introduzidas por Baldé (2002).

2.2.1. Indução da regeneração de rebentos ou pré-cultura

Vinte e quatro horas antes do início dos bombardeamentos, são praticados, no limbo de folhas de tabaco, incisões transversais à nervura central, com espaçamentos de 0,5 mm. As folhas são colocadas no centro de caixas de Petri com 8 cm, contendo meio de regeneração MS com metade da concentração nutricional, 15 g/L de sacarose, 7 g/L de agar, pH 5,6-5,7 e 1 mg/L de benzilaminopurina (BA ou BAP), a citocinina que irá promover a divisão celular.

Em cada ensaio de bombardeamento, uma caixa é preparada para o controlo da regeneração, pelo que não é sujeita a bombardeamentos ou pressão selectiva com antibióticos. Outra caixa é preparada para o controlo da selecção: não é sujeita a bombardeamentos e os explantes são sujeitos a pressão selectiva, em meio suplementado com higromicina.

2.3. Desinfecção e lavagem das partículas

Num tubo de 1,5 mL pesa-se 7 mg de partículas de ouro, com 1 µm de diâmetro, lavando-se de seguida com 1 mL de etanol a 100% (v/v). Agita-se rapidamente no vórtex e deixa-se repousar. Retira-se o etanol com o auxílio de uma micropipeta e repete-se todo o processo de lavagem duas vezes. Desta forma são retiradas partículas de dimensão inferior a 1 µm.

2.3.1. Revestimento de partículas de ouro com DNA

O DNA poderá corresponder a DNA plasmídico preparado para transfecção ou a uma cassette de DNA linear com os genes de interesse e respectivos promotores e terminadores. Durante esta demonstração, as partículas serão revestidas com DNA plasmídico.

2.3.2. Revestimento das partículas

Num tubo de centrífuga contendo as partículas de ouro lavadas, coloca-se 23 µL de DNA à concentração de 250-300 ng/µL. De seguida, agita-se rapidamente no vórtex. Mantendo sempre o tubo em agitação no vórtex, precipita-se o DNA sobre as micropartículas com 50 µL de cloreto de cálcio 2,5 M, adicionando também 2 µL de espermidina 1 M e 20 µL de polietilenoglicol (PEG) a 25% (v/v). A espermidina é uma poliamina usada para aumentar as cargas estáticas nas regiões ricas em G e C, aumentando assim a eficiência do revestimento. O PEG actua como agente adesivo. Agita-se 10 minutos em vórtex. Descarta-se o sobrenadante e, de seguida, lava-se com 500 µL de etanol a 100% (v/v), agita-se o tubo com toques de dedo, centrifuga-se brevemente e descarta-se o sobrenadante. Repete-se esta lavagem uma vez. Ressuspende-se as partículas em 30 µL de etanol a 100% (v/v) e coloca-se no aparelho de ultrasons (3000512, Selecta, Madrid, Espanha), durante 1 minuto, para ajudar a homogenizar a suspensão. Imediatamente a seguir, distribui-se 10 µL partículas por 3 macroprojecteis e deixa-se secar durante 10 minutos, numa câmara de fluxo laminar. Cada preparação de revestimento de partículas como aqui descrito permite realizar 3 bombardeamentos.

2.4. Bombardeamento de explantes de folha de tabaco

Nos bombardeamentos demonstrados vão ser utilizados discos de rotura de 450 psi e a distância percorrida pelos microprojecteis até atingirem as células-alvo será de 12 cm.

Antes de iniciar os bombardeamentos procede-se à desinfecção do aparelho e do material acessório. O interior da câmara de fluxo laminar é desinfectado por vaporização com etanol a 70% (v/v). O material acessório (discos de rotura, macroprojecteis, suportes de ecrãs de paragem e ecrãs de paragem) é desinfectado por submersão em etanol a 70% (v/v) durante 15 minutos. O bombardeamento dos explantes pode, desta forma, ser efectuado em condições de assépsia.

Após distribuição e secagem de 10 µL da suspensão de partículas de ouro revestidas por DNA plasmídico (≈ 1 µg DNA/mg de ouro) sobre a zona central de cada macroprojectil, montam-se todos os componentes do aparelho. A caixa de Petri com os explantes é colocada no interior da câmara de amostragem, dando-se início aos disparos, procedendo do seguinte modo:

1. cria-se vácuo no interior da câmara de amostragem (até aos 25 in.Hg)
2. introduz-se hélio no tubo de aceleração de gás. Quando a pressão de hélio atingir um valor de 450 psi, e acima da pressão suportada pelo disco de rotura, ocorre o disparo;
3. introduz-se ar na câmara de amostragem, muda-se a posição da caixa de *Petri* com o material vegetal e procede-se à substituição do disco de rotura, do macroprojectil e do ecrã de paragem;
4. efectua-se os restantes bombardeamentos, procedendo-se como em 1, 2 e 3.

2.5. Selecção dos transformantes com antibiótico

A pressão selectiva começa uma semana após os bombardeamentos (Batista-Castro, 2004). Os rebentos putativamente transformados com menos de 1 cm de altura são colocados em meio de regeneração suplementado com 25 mg/L de higromicina. Os rebentos com mais de 1 cm de altura são transferidos para meio MS com antibiótico, retirando a citocinina do meio e permitindo o seu alongamento.

Após o período de selecção (cerca de 2 meses), as plantas putativamente transformadas são transferidas para meio MS sem antibiótico.

Referências

1. Baldé, A. 2002. Controlo do amadurecimento do fruto de *Carica papaya* L. (papaia) por silenciamento de genes. Dissertação para a obtenção do Grau de Doutor em Biologia (Biotecnologia Vegetal). Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, 214 pp.
2. Batista-Castro, D. 2004. Dissertação para a obtenção do Grau de Doutor em Biologia (Biotecnologia Vegetal). Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa. 194 pp.
3. Murashige, T., Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. *Physiol. Plant.*, 15, 473-497.
4. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. 1989. *Molecular cloning – a laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor, Laboratory Press, New York, USA.
5. Sanford, J.C., deVit, M.J., Russell, J.A., Smith, F.D., Harpending, P.R., Roy, M.K., Johnston, S.A. 1991. An improved helium-driven bioistic device. *Technique*, 3, 3-16.
6. Hilliou, F., Christou, P., Leech, M. J. 1999. Development of an efficient transformation system for *Catharanthus roseus* cell cultures using particle bombardment. *Plant science* 140: 179-188.